

sebia

HYDRAGEL 1 IF *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4301

HYDRAGEL 2 IF *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4302

HYDRAGEL 4 IF *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4304

Ref. 4381*

HYDRAGEL 4 IF *Amidoschwarz / Amidoblack*

Ref. 4308

HYDRAGEL 9 IF *Violet Acide / Acid Violet*

Ref. 4309

Ref. 4382**

Masque dynamique / Dynamic mask

IVD

CE

2009/01

ESPECIFICACIONES DE USO

Los kits HYDRAGEL 1 IF, 2 IF, 4 IF y 9 IF permiten la detección de proteínas monoclonales en el suero y la orina humanos, mediante inmunofijación en gel de agarosa en el sistema semiautomático HYDRASYs.

El sistema HYDRASYs permite realizar todas las etapas hasta la obtención del gel listo para la interpretación. Las proteínas son separadas en tampón alcalino (pH 9,1) y luego son inmunoprecipitadas con antisueros de diferentes especificidades: anti-cadenas pesadas gamma (Ig G), alfa (Ig A), y mu (Ig M) y anti-cadenas ligeras kappa y lambda (libres y ligadas). Después de la inmunofijación, las proteínas precipitadas son coloreadas con una solución de violeta ácido o de negro amido. El exceso de colorante es eliminado en medio ácido.

Cada gel de agarosa está pensado para analizar:

- 1 muestra en el kit HYDRAGEL 1 IF,
- 2 muestras en el kit HYDRAGEL 2 IF,
- 4 muestras en los kits HYDRAGEL 4 IF,
- 9 muestras en los kits HYDRAGEL 9 IF.

Los kits HYDRAGEL 4 IF están disponibles con el colorante violeta ácido o con negro amido.

Para uso diagnóstico *In Vitro*.

PRINCIPIO DEL TEST

Las bandas anormales de las separaciones electroforéticas de proteínas de suero y orina, principalmente aquellas situadas en las fracciones de beta globulinas y de gamma globulinas, son siempre sospechosas de ser proteínas monoclonales (proteínas-M, paraproteínas, inmunoglobulinas monoclonales) y por lo tanto, son un indicio de gammopatías monoclonales. Para identificar esas bandas anormales se aplica la técnica de la inmunofijación.

La electroforesis seguida de inmunofijación es una técnica sencilla que permite que una proteína sea retenida después de la electroforesis, *in situ*, mediante la formación de un complejo insoluble con su anticuerpo. Es fácil de realizar en cuatro etapas y de fácil interpretación:

1. Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de agarosa.
2. Inmunofijación (inmunoprecipitación) de las proteínas separadas electroforéticamente – los carriles de migración electroforética apropiados son recubiertos con los antisueros individuales. Los antisueros difunden dentro del gel y precipitan los antígenos correspondientes cuando están presentes. Las proteínas del carril de referencia son fijadas con una solución fijadora.
3. Las proteínas solubles no precipitadas se eliminan del gel mediante un blotting y un lavado. La precipitación del complejo antígeno- anticuerpo queda fijado en la matriz del gel.
4. Los precipitados y las proteínas fijadas son visualizados mediante tinción.

Para identificar de forma precisa la naturaleza de la banda monoclonal, la muestra es analizada en seis carriles. Después de la electroforesis, el carril ELP sirve de referencia gracias a que la solución fijadora ha precipitado todas las proteínas presentes; los otros cinco carriles permiten caracterizar la o las bandas monoclonales gracias a anticuerpos específicos anti-cadenas pesadas gamma (Ig G), alfa (Ig A) y mu (Ig M) y anti-cadenas ligeras kappa y lambda (libres y ligadas).

Esta técnica sencilla y rápida proporciona una imagen clara y fácilmente interpretable.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS EN LOS KITS HYDRAGEL 1 IF, HYDRAGEL 2 IF, HYDRAGEL 4 IF E HYDRAGEL 9 IF

KIT HYDRAGEL 1 IF KIT HYDRAGEL 2 IF KITS HYDRAGEL 4 IF KITS HYDRAGEL 9 IF	PN 4301 PN 4302	PN 4304 PN 4309	PN 4308	PN 4381* PN 4382**
Geles de Agarosa (listos para su uso)	10 geles	10 geles	10 geles	80 geles
Esponjas tamponadas (listas para su uso)	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2	80 bolsas de 2
Diluyente del colorante (solución stock)			1 vial de 60 ml	
Colorante Negro Amido (solución stock)			1 vial de 20 ml	
Colorante Violeta Acido (solución stock)	1 vial de 75 ml	1 vial de 75 ml		8 viales de 75 ml
Diluyente (listo para su uso)	1 vial de 3,2 ml	1 vial de 32 ml	1 vial de 32 ml	2 viales de 80 ml 3 viales de 80 ml
Solución Fijadora (lista para uso)				1 vial de 2,9 ml
Inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas gamma (listo para usar)				1 vial de 2,0 ml
Inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas alfa (listo para usar)				1 vial de 2,0 ml
Inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas mu (listo para usar)				1 vial de 2,0 ml
Inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas ligeras kappa (libres y ligadas) (listo para usar)				1 vial de 2,0 ml
Inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas ligeras lambda (libres y ligadas) (listo para usar)				1 vial de 2,0 ml
Applicadores (listos para su uso)	1 caja de 10	2 cajas de 10 3 cajas de 10	2 cajas de 10	16 cajas de 10 24 cajas de 10
Segmentos para antisueros (listos para usar)	1 caja de 10	1 caja de 10	1 caja de 10	8 cajas de 10
Papeles de Filtro-finos	1 paquete de 10	1 paquete de 10	1 paquete de 10	8 paquetes de 10
Papeles de Filtro-gruesos	1 paquete de 10	1 paquete de 10	1 paquete de 10	8 paquetes de 10

(*) HYDRAGEL 4 IF MAXI-KIT

(**) HYDRAGEL 9 IF MAXI-KIT

NOTA: La solución fijadora y los antisueros se comercializan por separado excepto en los MAXI-KITS (consulte REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :

Los elementos de un mismo kit deben utilizarse conjuntamente y según las instrucciones incluidas.

LEER ATENTAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

1. GELES DE AGAROSA

Preparación

Los geles de agarosa están listos para el uso. Cada gel contiene: agarosa, 8 g/l ; tampón tris-barbital pH 9.1 ± 0.1 ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas

ATENCIÓN: Los geles de Agarosa contienen barbital 0.31 % barbital sódico 0.34 % ¡No ingerir! ¡Si se ingiere accidentalmente consultar inmediatamente al médico!

Uso

Medio de soporte para la electroforesis de proteínas e inmunofijación.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar los geles horizontalmente en sus recipientes protectores originales a temperatura ambiente (15 a 30 °C) o refrigerados (2 a 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit y en sus recipientes protectores. (La flecha situada en la cara frontal de la caja del kit debe apuntar hacia arriba). Evitar su almacenamiento cerca de una ventana o de una fuente de calor. Evitar variaciones importantes de temperatura durante su almacenamiento. NO CONGELAR.

Desechar cuando:

- (i) haya cristales o precipitados en la superficie del gel o su textura sea muy blanda (consecuencias de la congelación del gel) ;
- (ii) se observe crecimiento bacteriano o fúngico ;
- (iii) se evidencie una cantidad excesiva de líquido en el recipiente del gel (consecuencia de la exudación del tampón debida a un almacenamiento inadecuado).

2. ESPONJAS TAMPONADAS

Preparación

Las esponjas tamponadas están listas para su uso. Contienen: tampón tris-barbital pH 9.1 ± 0.3 ; azida sódica ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un resultado óptimo.

ATENCIÓN: El tampón de las esponjas contiene barbital 0.92 %, barbital sódico 1.03 % y azida sódica 0.30 %. ¡No ingerir! ¡En caso de ingestión accidental, consultar inmediatamente al médico! Cuando sea posible, evitar el contacto con ácidos, plomo o cobre, ya que se conoce su tendencia a formar compuestos explosivos con la azida sódica.

Uso

Las esponjas tamponadas funcionan como reservorio de tampón de electroforesis y aseguran el contacto entre el gel y los electrodos.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Las esponjas tamponadas pueden conservarse a temperatura ambiente o en la nevera.

Deben ser conservadas horizontalmente en su bolsa protectora (la flecha situada en la parte frontal del kit debe apuntar hacia arriba).

Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en su bolsa protectora. NO LAS CONGEELE.

Deseche las esponjas tamponadas si la bolsa está abierta o si las esponjas están secas.

3. DILUYENTE DEL COLORANTE (Ref. N° 4308)

Preparación

El diluyente del colorante concentrado debe ser usado como se ha descrito en el párrafo "COLORANTE NEGRO AMIDO". Contiene una solución ácida.

Uso

Para la preparación del colorante negro amido.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El diluyente del colorante concentrado puede conservarse a temperatura ambiente o en la nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de diluyente. NO LO CONGEELE.

No le añada azida sódica.

4. COLORANTE NEGRO AMIDO (Ref. N° 4308)

Preparación

El colorante negro amido concentrado es una solución viscosa que puede gelificarse, lo que no afecta de ningún modo a la calidad de la solución final y su capacidad de coloración.

Para obtener una perfecta reconstitución del colorante, siempre hay que prepararlo como se indica a continuación :

1. Añada unos 15 mL de diluyente del colorante en el vial de negro amido concentrado.
2. Cierre el vial con cuidado.
3. Agite el vial intensamente durante un mínimo de 5 segundos.
4. Vierta la solución obtenida en el recipiente de preparación de la solución de coloración.
5. Repita esta operación dos veces, o tres veces si es necesario.
6. Vierta el resto de diluyente en el recipiente de preparación de la solución de coloración.
7. Complete hasta 300 mL con agua destilada o desionizada.
8. Agite esta solución de 5 a 10 minutos.

El colorante está listo para usar.

NOTA : Una reconstitución incompleta del colorante puede implicar una mala coloración de la fracción albúmina (disminución de su porcentaje o aparición de un agujero blanco en el centro de la fracción).

Después de la dilución, la solución colorante contiene: solución ácida pH = 2 ; negro amido, 4 g/L ; etilén-glicol, 6,7 % ; aditivos inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: Nocivo en caso de ingestión.

Uso

Para la coloración de los geles después de la separación electroforética de las proteínas.

IMPORTANTE: El colorante está destinado para colorear sólo 10 geles. Cambie el colorante después de 10 usos.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de colorante concentrada y diluida pueden conservarse a temperatura ambiente o en la nevera, en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de colorante. La solución diluida es estable durante 1 mes. El período de estabilidad puede prolongarse a 3 meses si la solución diluida se conserva en nevera. Es imperativo colocar el contenedor cerrado en nevera inmediatamente después de cada uso. No almacene la solución de colorante diluida cerca de una fuente de calor.

5. COLORANTE VIOLETA ÁCIDO (Ref. N° 4301, 4302, 4304, 4309, 4381 y 4382)

Preparación

El vial de la solución stock de colorante se diluye hasta 300 ml. con agua destilada o desionizada. Después de la dilución, la solución de trabajo del colorante contiene: solución ácida pH = 2 ; violeta ácido, 0,2 g/dL ; etilén-glicol, 3,25 % ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: *Es perjudicial si se ingiere.*

Uso

Para la tinción de los geles con separación electroforética de proteínas y posterior inmunofijación.

IMPORTANTE: El colorante está destinado para la coloración de 10 geles. Cambie el colorante después de su utilización en 10 coloraciones.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar ambas soluciones, stock y de trabajo del colorante, a temperatura ambiente o refrigeradas en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución stock de colorante es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución de trabajo de colorante es estable 6 meses

6. DILUYENTE

Preparación

El Diluyente de muestras es listo para su uso. Contiene: tampón alcalino pH 7.5 ± 0.3 ; azul de bromofenol ; aditivos, no tóxicos a las concentraciones utilizadas, necesarias para la obtención de resultados óptimos.

Uso

Dilución de muestras. El azul de bromofenol actúa como marcador de la aplicación y migración posterior.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar a temperatura ambiente o refrigerado. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o la etiqueta del vial. El diluyente debe estar exento de precipitados.

7. CAJA DE ANTISUEROS Y SOLUCIÓN FIJADORA (Ref. N° 4381 y 4382)

7.1 ANTISUEROS

Preparación

Los antisueros están listos para su uso. Contienen inmunoglobulinas totales de mamífero anti-humanas. Cada reactivo tiene un color específico para evitar errores al utilizarlos. El color es el mismo que el de las etiquetas de los viales.

Cuando los antisueros presentan una ligera turbidez o precipitados, generalmente basta con poner los viales a temperatura ambiente unos 10 minutos antes de su utilización. Si la turbidez persiste, no perturbará la reacción inmunológica. Si hay un precipitado insoluble, se recomienda centrifugar los antisueros durante 5 minutos a 3000 r.p.m.

Utilización

Para la inmunoprecipitación de las proteínas separadas mediante electroforesis.

Los antisueros pueden ser de orígenes animales diferentes. Es por tanto imperativo no mezclar dos viales diferentes de antisueros, incluso si son de la misma especificidad, y SIEMPRE hay que cambiar la punta de la pipeta al cambiar de vial.

IMPORTANTE: Para evitar cualquier contaminación entre los diferentes reactivos, es imperativo poner cada tapón sobre el vial correspondiente después de usarlo.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Los antisueros deben ser conservados en la nevera (entre 2 y 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas de los viales de antisuero.

NOTA: *Durante el transporte, los antisueros pueden permanecer a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) durante 15 días sin que esto afecte a la calidad del test.*

7.2 SOLUCIÓN FIJADORA

Preparación

La solución fijadora está lista para su uso. Contiene: una solución ácida y aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Tiene un color específico para evitar errores al usarlo.

Utilización

Para la fijación de las proteínas separadas mediante electroforesis en el carril de referencia (ELP).

IMPORTANTE: Para evitar cualquier contaminación entre los diferentes reactivos, es imperativo poner cada tapón sobre el vial correspondiente después de usarlo.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución fijadora puede conservarse a temperatura ambiente o refrigerada. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de solución fijadora.

Debe estar exenta de precipitados.

8. APLICADORES

Uso

Aplicadores precortados de un solo uso para la aplicación de la muestra.

Almacenamiento

Almacenar los aplicadores en un lugar seco a temperatura ambiente o refrigerados.

9. SEGMENTOS PARA ANTISUEROS

Utilización

Segmentos coloreados, de un solo uso, para la aplicación de la solución fijadora y de los antisueros en la inmunofijación.

ATENCIÓN: *Manipule con cuidado los segmentos que contengan antisueros.*

10. PAPELES DE FILTRO FINOS

Uso

Papeles finos absorbentes precortados, de un solo uso, para secar el exceso de humedad de la superficie del gel antes de la aplicación de la muestra.

Conservación

Los papeles de filtro finos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

11. PAPELES DE FILTRO GRUESOS

Uso

Papeles de filtro gruesos, de un solo uso, para la eliminación de proteínas no precipitadas del gel, después de haber realizado la inmunofijación.

Conservación

Los papeles de filtro gruesos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. CAJA DE ANTISUEROS Y SOLUCIÓN FIJADORA PARA IF (para los kits 4301, 4302, 4304, 4308 y 4309)

La Caja de Antisueros y Solución Fijadora para inmunofijación IF (SEBIA, referencia N° 4315) contiene cinco viales de antisueros y un vial de solución fijadora de 1 ml cada uno, **específicos de la técnica de inmunofijación realizada con la plantilla dinámica.**

1.1 ANTISUEROS

Vea el párrafo precedente 7.1.

1.2 SOLUCIÓN FIJADORA

Vea el párrafo precedente 7.2.

2. SOLUCIÓN DECOLORANTE

Preparación

Cada vial de Solución Decolorante stock (SEBIA, PN 4540, 10 viales de 100 ml) se diluye hasta 100 litros con agua destilada o desionizada. Es conveniente diluir sólo 5 ml de la solución stock hasta 5 litros, volumen del contenedor de la solución decolorante. Después de la dilución, la solución decolorante de trabajo contiene: ácido cítrico, 0.5 g/l.

Uso

Para la destinción : eliminación del exceso de tinción y de fondo de los geles.

Para el lavado del compartimento de coloración.

Para neutralizar la acidez del decolorante, introduzca dentro del contenedor de desechos vacío 15 ml de sosa al 50 % (solución comercial).

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar la solución decolorante stock a temperatura ambiente o refrigerada. La solución stock de decolorante es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. **NO CONGELAR.** La solución decolorante de trabajo es estable una semana a temperatura ambiente en un contenedor cerrado. No añadir azida sódica.

Deshechar la solución decolorante de trabajo si cambia su apariencia, p. ej., si se vuelve turbia debido a contaminación bacteriana.

Para evitar la proliferación microbiana en la solución decolorante diluida que se vaya a almacenar durante más de una semana, añada 5 µL/dL de ProClin 300.

El decolorante diluido al que se ha añadido ProClin es estable en un contenedor cerrado a temperatura ambiente o en la nevera hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de decolorante.

3. SOLUCIÓN DE LAVADO HYDRASYS

Preparación

Cada vial de la Solución stock de lavado HYDRASYS (SEBIA, PN 4541, 10 viales, 80 ml cada uno) se diluye hasta 5 litros con agua destilada o desionizada. Después de la dilución, la solución de trabajo de lavado contiene: tampón alcalino pH 8.8 ± 0.3 ; azida sódica.

ATENCIÓN: La solución stock de lavado contiene azida sódica 0.625 %. ¡No ingerir! ¡En caso de ingestión accidental, consultar inmediatamente al médico! Cuando sea posible, evitar el contacto con ácidos, plomo o cobre, ya que se conoce su tendencia a formar compuestos explosivos con la azida sódica. Lavar siempre con gran cantidad de agua.

Uso

Sirve para limpiar el Compartimento de Tinción del HYDRASYS. Usar periódicamente, p. ej., si el instrumento se usa a diario, lavar el compartimento de tinción semanalmente.

Ver la hoja de instrucciones para las indicaciones de uso.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar ambas soluciones de lavado, stock y de trabajo, a temperatura ambiente o refrigeradas en contenedores cerrados. La solución stock de lavado es estable hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del vial.

Deshechar la solución de trabajo de lavado si cambia su apariencia, p. ej., si se vuelve turbia debido a contaminación bacteriana.

4. FLUIDIL

Preparación

El Fluidil (SEBIA, PN 4587, 5 ml) está listo para su uso.

Uso

Para diluir muestras turbias o viscosas, p. ej., sueros que contienen crioglobulinas o criogeles.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar a temperatura ambiente, es estable hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del vial de Fluidil.

El Fluidil debe mostrar ausencia de precipitados.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema HYDRASYS SEBIA, referencia N° 1210 ó N° 1211.
2. Pipeteador, manual automático, como el HYDRAPLUS SEBIA, referencia N° 1216 ó HYDRAPLUS 2 SEBIA, referencia N° 1217, para la carga de los aplicadores o de los segmentos para antisueros.
3. Cámara húmeda, referencia N° 1270, suministrada con el sistema HYDRASYS.
4. Contenedores de reactivo de plástico suministrados con el sistema HYDRASYS.
5. Guía metálica de la plantilla SEBIA, suministrada con el sistema HYDRASYS.
6. Plantilla dinámica, SEBIA, referencia N° 1255.
7. Pipetas de 8 µl, 10 µl, 12 µl, 20 µl, 100 µl y 200 µl.

MUESTRAS PARA EL ANALISIS

Extracción y almacenamiento de las muestras

Se recomienda analizar muestras frescas. El suero y la orina deben obtenerse de acuerdo con los procedimientos establecidos de uso en los laboratorios clínicos. Refrigere las muestras (2 a 8 °C) tan pronto como sea posible después de su obtención, durante una semana. Para periodos de almacenamiento más prolongados, almacene las muestras congeladas (son estables durante un mes al menos). Congelar los sueros con azida sódica, 0,2 g/l, mejora la estabilidad del almacenaje.

La conservación de las orinas congeladas mejora añadiendo a la muestra tampón HEPES 0,1 M (pH 6,75) y / o azida sódica 0,2 g/l.

IMPORTANTE: No utilice conservantes que contengan ácido bórico.

Las muestras descongeladas pueden dar lugar a ligeras marcas de aplicación debidas a la desnaturalización de proteínas o lipoproteínas.

Preparación de las muestras

1. Sueros

Diluya 1 muestra para el HYDRAGEL 1 IF, 2 ó 4 muestras para el HYDRAGEL IF 2/4 según el kit y 9 muestras para el HYDRAGEL 9 IF.

Diluirlos sueros antes de su aplicación para prevenir el efecto prozona, consecuencia de elevados niveles de antígeno, mezclando de forma homogénea.

CARRIL	SUERO (µl)	DILUYENTE (µl)
Carril inmunológico G	20	100
Perfil electroforético ELP y los otros carriles inmunológicos	30	60

Casos particulares

- Si la concentración de inmunoglobulinas es superior a 20 g/l (en caso hipergammaglobulinemia), se recomienda aumentar el factor de dilución de las muestras (excepto en el carril ELP) con el fin de obtener una concentración de inmunoglobulinas normal.
- Si la concentración de inmunoglobulinas es inferior a 5 g/l (en caso de hipogammaglobulinemia), se recomienda disminuir el factor de dilución de las muestras.
- Para realizar una investigación de la presencia de cadenas ligeras libres séricas o urinarias se recomienda usar el programa de migración "BENCE JONES".

Para ello, el análisis podrá realizarse con el kit IF y con los antisueros ANTI-KAPPA LIBRE (SEBIA, referencia N° 4370) y ANTI-LAMBDA LIBRE (SEBIA, referencia N° 4371) o con el kit HYDRAGEL 1, 2 ó 4 BENCE JONES (SEBIA, referencias N° 4321, 4322 ó 4324).

En caso de búsqueda de cadenas libres séricas, diluya el suero con salina o con el diluyente para inmunofijación prediluido a 1/4 (1 volumen de diluyente + 3 volúmenes de agua destilada o desionizada) a 1/10 para los carriles ELP, GAM, K y L (1 volumen de suero + 9 volúmenes de diluyente prediluido o de salina) y a 1/3 (1 volumen de suero + 2 volúmenes de diluyente prediluido o de salina) para los carriles revelados con los antisueros anti-kappa libre y anti-lambda libre.

Si la concentración de inmunoglobulinas es inferior a 5 g/l, se recomienda diluir menos el suero; por ejemplo, a 1/5 para los carriles ELP, GAM, K y L y a 1/2 para los carriles KI y LI.

- Después de la conservación en la nevera (entre 2 y 8 °C) o de la congelación, algunos sueros (en particular los que contienen una crioglobulina o un criogel) se vuelven viscosos o turbios. Estos sueros presentan dificultades de aplicación cuando se usa el aplicador de HYDRASYS, ya que no difunden bien en los dientes del aplicador. Hay que tratar estos sueros con Fluidil antes de aplicarlos: añada 25 µl de Fluidil a 75 µl de suero, agite 15 segundos en el vórtex, y luego siga con el procedimiento normal.
- Algunas paraproteínas están polimerizadas, y el suero presenta entonces una banda de aspecto "monoclonal" en todos los carriles. Prepare una solución reductora añadiendo un 1 % de β-mercaptoetanol (BME) en Fluidil. Trate estos sueros antes de aplicarlos con esta solución: añada 25 µl de solución reductora a 75 µl de suero puro, agite en el vórtex y deje en reposo durante 15 minutos como mínimo (máximo 30 minutos), y luego siga con el procedimiento normal.

2. Orinas concentradas

La mayoría de las muestras de orina deben ser concentradas, mediante un dispositivo apropiado, para conseguir que la concentración proteica total sea de unos 5 g/l o una concentración de inmunoglobulinas totales alrededor de 1 g/l. Si no se conoce la concentración proteica urinaria, concentre la orina de 20 a 100 veces mediante un dispositivo apropiado.

IMPORTANTE: Algunas orinas contienen una concentración importante de sales. Éstas producen una deformación del gel durante la migración que puede alterar los perfiles después de la electroforesis. Conviene eliminar este exceso de sales mediante diálisis.

En caso de orinas turbias (concentradas o no), se recomienda eliminar las partículas centrifugando las muestras (durante 10 minutos a 3000 r.p.m.) o mediante filtración (con un filtro de 0,45 µm) para obtener una buena difusión en los aplicadores.

La sensibilidad puede mejorarse aumentando el tiempo de aplicación de las muestras y el tiempo de incubación con el antisuero (usando el programa de migración "BENCE JONES"). El límite de detección de una proteína monoclonal es entonces entre 10 y 50 mg/l. **En esta técnica las orinas pueden analizarse sin concentrar o concentradas para mejorar la sensibilidad.**

NOTA: Una concentración demasiado importante de la muestra puede acarrear la aparición de artefactos tales como falsas bandas de aspecto "monoclonal". Es por tanto importante no concentrar las orinas por encima de la concentración recomendada.

Caso particular

Algunas cadenas ligeras tienden a polimerizarse y a formar agregados, y la orina presenta entonces una banda de aspecto « monoclonal » en todos los carriles. Trate las muestras como sigue : mezcle 100 µl de orina y 5 µl de β-mercaptoetanol diluido previamente a 1/10 con agua destilada o desionizada o con solución salina, agite en el vórtex y deje que incube de 10 a 15 minutos, y luego siga con el procedimiento habitual.

Muestras a descartar

- No utilice plasma. El fibrinógeno da lugar a una banda cerca del punto de aplicación. Esta banda puede falsear la interpretación del resultado (ya que puede confundirse con una gammapatía).
- No use muestras hemolizadas.
- No use muestras de orina antiguas o mal conservadas, ya que pueden haber sido alteradas por degradaciones enzimáticas.

PROCEDIMIENTO

El sistema HYDRASYS es un instrumento semiautomático multiparamétrico. Las etapas automáticas incluyen el procesamiento de los geles de agarosa HYDRAGEL en la siguiente secuencia: aplicación de la muestra, migración electroforética, secado, tinción, destinción y secado final. Las etapas manuales incluyen el manejo de las muestras y los geles, y la puesta en marcha del instrumento para la operación.

LEER CUIDADOSAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL HYDRASYS

I. PUESTA EN MARCHA DE LA MIGRACIÓN

1. Encender el HYDRASYS.
2. Coloque un aplicador para el HYDRAGEL 1 IF ó HYDRAGEL IF 2/4 (2 muestras), dos aplicadores para el HYDRAGEL IF 2/4 (4 muestras) ó 3 aplicadores para el HYDRAGEL 9 IF, en una superficie plana, con los números de los pocillos hacia arriba (Fig. 1).
 - Aplique 10 µl de muestra, suero diluido u orina concentrada, en cada pocillo. La carga de cada aplicador debe hacerse en menos de 2 minutos.

POCILLOS DE APLICACION :	CARRIL MIGRACION / IMMUNOFIJACION					
	ELP	G	A	M	K	L
HYDRAGEL 1 IF	1	2	3	4	5	6
HYDRAGEL IF 2/4						
MUESTRA No 1 O 3	2	3	4	5	6	7
MUESTRA No 2 O 4	9	10	11	12	13	14
HYDRAGEL 9 IF						
MUESTRA No 1, 4 O 7	1	2	3	4	5	6
MUESTRA No 2, 5 O 8	7	8	9	10	11	12
MUESTRA No 3, 6 O 9	13	14	15	16	17	18

IMPORTANTE: En el análisis hecho con HYDRAGEL IF 2/4, no utilice los pocillos 1, 8 y 15; se recomienda identificarlos previamente con un rotulador para evitar aplicar muestra en ellos por error.

- Colocar cada aplicador en la cámara húmeda, con el peine hacia arriba (asíros por el plástico protector del peine).

Ver la hoja de instrucciones de la cámara húmeda para más detalles.

- Deje que las muestras difundan durante 5 minutos después de la aplicación de la última muestra. Para una conservación prolongada (8 horas como máximo), coloque la cámara húmeda en la nevera.

3. Abrir la puerta del Módulo de migración y elevar los soportes de los electrodos y el aplicador.

ATENCIÓN: ¡Nunca cerrar la puerta cuando los soportes están elevados!

4. Seleccione en el menú el programa de migración "1 IF ME/MD" para el HYDRAGEL 1 IF, "2/4 IF ME/MD" para el HYDRAGEL IF 2/4 ó "9 IF MD" para el HYDRAGEL 9 IF.
5. Extraer las esponjas tamponadas de su envoltorio ; asírlas por los extremos de plástico. Engarzar los extremos de plástico agujereados con las puntas metálicas del soporte de los electrodos ; los extremos de plástico deben quedar encarrados al soporte (Fig. 2).

6. Abrir el contenedor del HYDRAGEL.

- Extienda un papel de filtro fino de manera rápida y uniforme sobre la superficie del gel para absorber el exceso de líquido. Retire el papel inmediatamente.

ADVERTENCIA: Para evitar que se deshidrate, no deje que el papel de filtro contacte con el gel durante mucho tiempo.

- Dispense 120 µl de agua destilada o desionizada para el HYDRAGEL 1 IF ó 200 µl para el HYDRAGEL IF 2/4 e HYDRAGEL 9 IF, en el centro inferior del cuadro serigrafiado en la placa del módulo de migración.
- Colocar el gel (la cara de agarosa hacia arriba) con su lado inferior en contacto con el tope inferior del marco serigrafiado (Fig. 3).
- Aplicar el gel en la superficie, haciéndolo contactar con el agua (Fig. 3). Asegurarse que no queden burbujas, que el agua esté extendida bajo toda la superficie del gel y que éste esté alineado con el marco serigrafiado.

7. Devolver ambos soportes a su posición original. Las esponjas tamponadas no deben tocar el gel. NO FORZAR LOS SOPORTES HACIA ABAJO.

8. Extraer el(los) aplicador(es) de la cámara húmeda. Asíro(los) por el plástico protector.

- Romper el plástico protector precortado del peine.
- Ponga el/los aplicador(es) en el soporte de los aplicadores:
 - HYDRAGEL 1 IF ó HYDRAGEL IF 2/4 (2 muestras) : posición N° 6,
 - HYDRAGEL IF 2/4 (4 muestras) : posiciones N° 3 y 9,
 - HYDRAGEL 9 IF : posiciones N° 2, 6 y 10.

IMPORTANTE: Los números impresos en el(los) aplicador(es) deben quedar de cara al usuario (Fig. 4).

Para una perfecta reproducibilidad de la zona de aplicación, desplace los aplicadores hacia uno de los lados del soporte de los aplicadores, por ejemplo hacia la izquierda.

9. Cerrar la puerta del módulo de migración.

10. Iniciar el procedimiento inmediatamente, presionando la tecla "START" (flecha verde) en el lado izquierdo del teclado.

IMPORTANTE: Asegurarse que la toma de aire en el lado derecho del instrumento no está bloqueada.

MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Los dos soportes descienden, con lo cual esponjas tamponadas y aplicador(es) entran en contacto con la superficie del gel.
- El soporte del aplicador se eleva.
- Migración a 10 W constantes para el HYDRAGEL 1 IF y a 20 W constantes para el HYDRAGEL IF 2/4, hasta que se hayan acumulado 42 Vh (durante unos 9 minutos) y a 20 W constantes hasta que se hayan acumulado 36 Vh (durante unos 7 minutos) para el HYDRAGEL 9 IF, a 20 °C, siendo la temperatura controlada por efecto Peltier.
- El soporte de los electrodos se eleva para desconectar los electrodos.
- Un pitido audible se produce al finalizar la migración.

En pantalla aparece el siguiente mensaje: " ⚡ AS".

NOTA: El módulo de migración permanece con la puerta cerrada durante los pasos de migración correspondientes.

II. PREPARACIÓN DE LA INMUNOFIJACIÓN

Los diferentes elementos de la plantilla dinámica (guía de referencia coloreada, segmento para antiseros, soporte del segmento, guía y reductor de superficie) aparecen en la figura 5.

Durante la migración, prepare la plantilla dinámica de la forma siguiente:

1. Ponga la guía de la plantilla dinámica en una superficie plana.

IMPORTANTE: El análisis de una o dos muestras con la plantilla dinámica necesita la utilización del reductor de superficie, que debe colocarse en la guía de la plantilla dinámica.
2. Ponga un segmento para antiseros en el soporte del segmento (Fig. 6):
 - Incline el segmento 45° y colóquelo en las patillas del soporte del segmento.
 - Apoyándose en estos resortes, gire el segmento para fijarlo en las muescas del soporte del segmento.

ATENCIÓN: Compruebe que el segmento esté fijado correctamente en el soporte del segmento: los salientes situados en los extremos del segmento deben estar bien encajados en las dos muescas del soporte del segmento.
3. Coloque el conjunto segmento – soporte del segmento en la guía de la plantilla dinámica (Fig. 7) (equipada con un reductor de superficie para el análisis de 1 ó 2 muestras) y luego ponga la guía de referencia coloreada, que indica los lugares en los que aplicar los reactivos, correspondiente a la técnica, sobre el soporte del segmento delante de los pocillos del segmento para antiseros (Fig. 8).
4. Aplique los reactivos, cuyo color se indica en la tabla inferior, en el segmento para antiseros:
 - Segmento de 6 pocillos para HYDRAGEL 1 IF : 8 µl por pocillo,
 - Segmento de 15 pocillos para HYDRAGEL IF 2/4 : 8 µl por pocillo para el análisis de 2 muestras, 12 µl por pocillo para el análisis de 4 muestras,
 - Segmento de 18 pocillos para HYDRAGEL 9 IF : 8 µl por pocillo.

CARRIL	REACTIVO	COLOR
ELP	Solución Fijadora	Amarillo
G	antisuero anti-cadenas pesadas gamma	Rosa
A	antisuero anti-cadenas pesadas alfa	azul oscuro
M	antisuero anti-cadenas pesadas mu	verde amarillento
K	antisuero anti-cadenas ligeras kappa (libres y ligadas)	verde claro
L	antisuero anti-cadenas ligeras lambda (libres y ligadas)	azul claro

NOTA: Para evitar errores en la aplicación, los reactivos están coloreados y el color del carril a rellenar aparece en la guía de referencia coloreada.

IMPORTANTE: En el análisis hecho con HYDRAGEL IF 2/4, no utilice los pocillos del segmento de antiseros que están en las posiciones 1, 8 y 15.

Aspire los reactivos sin que se formen burbujas de aire en la punta de la pipeta.

Para aplicar los reactivos (Fig. 9) :

- sostenga la pipeta inclinada,
- apoye ligeramente la punta de la pipeta en un lado del pocillo y dispense la gota de reactivo en el pocillo.

5. Retire la guía de referencia coloreada.

III. INMUNOFIJACIÓN

1. Abra la tapa del módulo de migración.
 2. Saque el/los aplicador/es y tírelo/s.
 3. Eleve los soportes de los electrodos y los aplicadores y saque las esponjas tamponadas cogiéndolas por las lengüetas y tírelas.
 - Saque los soportes de los electrodos y los aplicadores.
 - Limpie los electrodos con un pañuelo de papel humedecido.
 - Deje el gel en su lugar en el módulo de migración.
 4. Ponga en su lugar la plantilla dinámica de aplicación de reactivos de la forma siguiente (Fig. 10) :
 - coloque la barra metálica destinada al enganche de la plantilla dinámica con ayuda de los pernos de anclaje. (Una vez colocada, la barra metálica puede permanecer en el HYDRASYS) ;
 - coloque las muescas de la plantilla en las señales de la barra cogiendo la plantilla por la lengüeta ;
 - gire la plantilla para colocarla en la placa del HYDRASYS.

IMPORTANTE : Ajuste previamente la posición de la plantilla para obtener una correspondencia perfecta entre los perfiles electroforéticos del gel y los carriles de inmunofijación de la plantilla.
 5. Ponga el soporte del segmento en el punto más bajo de la guía, dirigido hacia el operario. Sostenga el conjunto soporte-segmento por el asa situada a la derecha y presione en el punto de apoyo central, de forma que el segmento contacte con el gel. Deje de presionar, y entonces los reactivos se extenderán bajo cada carril (Fig. 11).
 6. Inmediatamente, con ayuda del asa situada a la derecha, reparta los reactivos efectuando un movimiento lento y regular de ida y vuelta de la plantilla dinámica por encima del gel (la aplicación debe durar unos 5 segundos) (Fig. 12).
- ATENCIÓN: Durante esta operación, la plantilla sólo debe cogerse por el asa sin tocar la guía. No presione nunca por segunda vez: los reactivos podrían mezclarse.**

7. Saque la guía y la plantilla dinámica:

- Coja la guía por el asa ;
- Gire la guía alrededor de la barra metálica y sáquela ;
- Saque el segmento del soporte y tírelo.

ATENCIÓN: Manipule con cuidado los segmentos que contengan antisueros.

- Queda un ligero exceso de reactivos sobre el gel en forma de gota a la altura de los orificios de los pocillos al quitar la plantilla, sin ningún efecto en los resultados.

8. Cierre la tapa del módulo de migración.

9. Inicie el procedimiento inmediatamente apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).

En la pantalla aparece el mensaje: "[INCUBACION]".

INMUNOFIJACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 20 °C, controlados por efecto Peltier, durante 5 minutos.

- Suena un pitido y la tapa del módulo de migración se desbloquea.

En la pantalla aparece el mensaje: "♦ PAP".

NOTA: Durante la incubación, la tapa del módulo de migración permanece bloqueada.

IV. ABSORCIÓN CON PAPEL

1. Abra la tapa del módulo de migración.

2. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel:

- incline el papel de filtro grueso unos 45° y alinee el borde inferior del papel de filtro con el borde inferior del gel ;
- coloque el papel encima del gel.

ATENCIÓN: Presione sobre toda la superficie del papel de filtro para asegurar un contacto perfecto entre el gel y el papel.

3. Cierre la tapa del módulo de migración.

4. Inicie el procedimiento apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).

ABSORCIÓN CON PAPEL - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Absorción a 40 °C, controlados por efecto Peltier, durante 3 minutos.

En la pantalla aparece el mensaje: "[ABSORCION]".

- Suena un pitido.

En la pantalla aparece el mensaje: "♦ PAP".

V. SECADO DEL GEL

1. Abrir la tapa del módulo de migración

2. Extraer el papel de filtro, dejando el gel en su posición actual.

3. Cerrar la tapa.

4. Apretar la tecla "START" (flecha verde situada a la izquierda en el teclado).

SECADO DEL GEL - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Secado a 50 °C controlado mediante efecto Peltier, durante 6 minutos.

- Un pitido nos indica que debemos levantar la tapa. El gel permanecerá a 50 °C mientras la tapa permanece cerrada.

NOTA: El módulo de migración permanece cerrado mientras se produce el proceso de secado.

VI. PREPARACIÓN DE LAS ETAPAS DE LAVADO, COLORACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL GEL

1. Abrir la tapa.

2. Extraer el gel (una vez seco) para su procesamiento posterior.

3. Abrir el soporte del gel. Colocar el gel seco (con la superficie mirando hacia arriba) en los orificios de las dos varillas y cerrar el soporte. Comprobar que el gel está colocado adecuadamente dentro del soporte. (Fig. 13).

4. Colocar el soporte en el Módulo de Procesado / Coloración.

IMPORTANTE: Antes de comenzar con el procesamiento / coloración comprobar lo siguiente:

- Contenedor de Solución de lavado: contenido mínimo de 400 ml ;
- Contenedor de Colorante: 300 ml de colorante ;
- Contenedor de Decolorante: como mínimo 1 litro ;
- Contenedor de Deshechos vacío ;
- Los canales no utilizados deberán taparse.

5. Seleccionar el programa de coloración "IF ACID VIOLET" o "IF AMIDO" e iniciar el proceso apretando la tecla "START" (flecha verde situada a la derecha en el teclado).

Durante todas las secuencias de coloración, decoloración y secado, el sistema permanece bloqueado.

Después del enfriamiento de la cubeta, una señal sonora (bip) suena y el sistema se desbloquea (la ventilación se mantiene hasta la recuperación del porta-films).

NOTAS:

- La temperatura de la placa de migración puede descender hasta 20 °C mientras permanezca abierta la tapa (en menos de 5 minutos). En este momento podremos iniciar una nueva migración.
- Volver a colocar el portaaplicadores en su ubicación original.
- Lavar la placa de migración con un trapo suave ligeramente humedecido.

VII.FINAL DE LA COLORACIÓN DEL GEL

1. Saque el soporte del gel del compartimento de coloración; abra el soporte del gel y saque el gel seco.
2. Si es necesario, limpie el respaldo del gel (el lado de soporte de plástico) con un pañuelo de papel humedecido.

NOTA: En los geles con varias filas de muestras (2 ó 3), las longitudes de migración pueden ser ligeramente diferentes, sin ninguna repercusión en los resultados.

RESULTADOS

Interpretación

1. Suero

Ausencia de componentes monoclonales

- Un suero normal muestra una tinción tenue y difusa de las inmunoglobulinas policlonales en todas las pistas.
- Una hipergammaglobulinemia se caracteriza por una tinción fuerte y difusa en la zona de las gamma, sin presentar bandas claramente definidas.

Presencia de componentes monoclonales

- La presencia de una proteína monoclonal (gammapatía) se caracteriza por una banda monoclonal en las pistas gamma, alfa o mu, y en la pista kappa o lambda indistintamente. La banda monoclonal detectada, normalmente bien definida y focalizada, deberá estar posicionada a la misma altura que la previsible banda monoclonal localizada en la pista de referencia (ELP).
- Si no hay reacción con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas aplicados y hay reacción con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras, eso puede significar :
 - a) la presencia de una gammapatía de Ig D ó Ig E que habrá que confirmar con los antisueros anti-cadenas pesadas de ϵ ó δ .
 - b) la presencia de una cadena ligera libre que habrá que confirmar con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.
- La presencia de bandas en alguna de las pistas correspondientes a los antisueros anti cadenas ligeras y a su vez en las pistas correspondientes a los antisueros cadenas pesadas puede indicarnos una Gammapatía de cadenas pesadas (muy poco frecuente).

Presencia de dos o más componentes monoclonales

En algunos casos, la proliferación de varios clones de células B se muestran como varias bandas al realizar una inmunofijación :

- Una gammapatía biconal se caracteriza por la presencia de dos bandas en la zona correspondiente al las cadenas pesadas (iguales o diferentes) y dos bandas en la correspondiente a las cadenas ligeras (iguales o diferentes).
- Las inmunoglobulinas polimerizadas se caracterizan por la presencia de varias bandas en la misma cadena pesada y la misma cadena ligera. Habrá que realizar un tratamiento reductor con β -mercaptoetanol a la muestra para después volver a hacer la inmunofijación para confirmar la presencia de una sola anomalía monoclonal (Vea "Muestras para el análisis").
- Un perfil oligoclonal se caracteriza por la presencia de múltiples bandas en una o varias cadenas pesadas y en una o las dos cadenas ligeras.

Casos especiales

- Cuando se observa una banda monoclonal en la electroforesis (pista ELP), mas no se confirma mediante inmunofijación, debe sospecharse la presencia de fibrinógeno (plasma como muestra).
- Cuando se aprecia una única banda en todas las pistas podemos pensar en la presencia de una crioglobulina o una Ig M polimerizada. Despolimerizar con un agente reductor y repetir el procedimiento (ver "Muestras para análisis").
- En algunos casos de gammopatías de Ig A, el antisuero anti-cadenas ligeras puede presentar baja afinidad por la inmunoglobulina monoclonal, lo que dificulta su detección. En ese caso, se aconseja realizar la inmunofijación con el programa BENCE JONES, en el que la reacción está amplificada debido a un tiempo de incubación con el antisuero más largo (vea las instrucciones de uso de los kits HYDRAGEL BENCE JONES para saber cómo diluir los sueros).
- En caso de fondo policlonal importante, se aconseja aumentar la dilución de la muestra en los carriles de antisueros, especialmente en el carril Ig G.
- HYDRAGEL 9 IF: En los casos de gammopatías oligoclonales, se recomienda realizar las inmunofijaciones usando las técnicas HYDRAGEL 1, 2 ó 4 IF para obtener una mejor resolución en la zona gamma, ya que la zona de las gammaglobulinas es más alargada y facilita la visualización de bandas múltiples.

2. Orinas concentradas

El principio de interpretación es idéntico al descrito para el suero.

Una gammapatía (presencia de una inmunoglobulina monoclonal) se caracteriza por una banda estrecha detectada con uno de los anti-cadenas pesadas (gamma, alfa o mu) y con uno los anti-cadenas ligeras (kappa o lambda). La fracción monoclonal detectada, generalmente estrecha y bien visible, debe estar situada en el mismo nivel de migración que la banda detectada en el carril de referencia (ELP).

Una proteína de Bence Jones se caracteriza por:

- una banda monoclonal detectada con un anti-cadenas ligeras (libres y ligadas) kappa o lambda (carriles K o L),
- la ausencia de banda monoclonal con los anti-cadenas pesadas gamma, alfa o mu (carriles G, A o M).

Una proteína de Bence Jones que presenta diferentes estados de polimerización se caracteriza por:

- varias bandas detectadas con un anti-cadenas ligeras (libres y ligadas) kappa o lambda (carriles K o L),
 - la ausencia de banda monoclonal con los anti-cadenas pesadas gamma, alfa o mu (carriles G, A o M).
- Habrà que realizar un tratamiento reductor con β -mercaptoetanol a la muestra para después volver a hacer la inmunofijación usando antisueros anti-cadenas ligeras libres (anti-kappa libre o anti-lambda libre).

Una paraproteína sérica que pasa a la orina con ausencia de proteína de Bence Jones se caracteriza por:

- una banda monoclonal detectada con los anti-cadenas pesadas gamma, alfa o mu (carriles G, A o M),
- la misma banda detectada con un anti-cadenas ligeras (libres y ligadas) kappa o lambda (carriles K o L).

Una paraproteína sérica que pasa a la orina asociada a una proteína de Bence Jones se caracteriza por:

- una banda monoclonal detectada con un anti-cadenas pesadas gamma, alfa o mu (carriles G, A o M),
- dos bandas detectadas con uno o los dos anti-cadenas ligeras kappa y/o lambda (libres y ligadas).

Interferencias y limitaciones

Vea MUESTRAS PARA ANÁLISIS.

La presencia de fibrinógeno o de fibrina residual puede implicar que aparezca una banda artefactual en todos los carriles; la intensidad de la banda puede variar según el carril, y generalmente es más intensa en el carril revelado con el antisuero anti-Ig A.

La utilización de antisueros distintos a los específicos para la técnica de inmunofijación realizada con la plantilla dinámica puede afectar a la calidad de los resultados

Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no puede darse ninguna garantía respecto a la detección de la totalidad de todos los componente monoclonales.

Resolución de problemas

Avisar al Servicio de Atención Técnica del distribuidor cuando el test no funcione, pese a haber seguido cuidadosamente las instrucciones para la preparación y almacenaje de los materiales y para el procedimiento a seguir.

Las hojas de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Reproducibilidad intraserial

Técnica HYDRAGEL 4 IF

Migración de tres (3) muestras de suero patológicas : Dos sueros con una fuerte gammapatía monoclonal y un suero que presenta dos paraproteínas débiles.

La migración y la inmunofijación de cada muestra se ha realizado con 2 lotes diferentes de geles HYDRAGEL IF 2/4 a razón de 4 análisis por gel, seguidos de una coloración con violeta ácido.

Técnica HYDRAGEL 9 IF

Migración de tres (3) muestras de suero patológicas con una fuerte gammapatía monoclonal, presentando cada muestra una paraproteína.

La migración y la inmunofijación de cada muestra se ha realizado con 2 lotes diferentes de geles HYDRAGEL 9 IF a razón de 9 análisis por gel, seguidos de una coloración con violeta ácido.

Todas las muestras analizadas proporcionan los mismos resultados para los 2 lotes de geles probados. Los perfiles obtenidos son característicos de cada una de las muestras analizadas.

En la técnica HYDRAGEL 4 IF, la inmunofijación sólo detecta una banda monoclonal en las dos primeras muestras, y detecta las dos bandas monoclonales esperadas en la tercera muestra patológica.

En la técnica HYDRAGEL 9 IF, la inmunofijación sólo detecta una banda monoclonal en cada una de las tres muestras patológicas.

Reproducibilidad interserial

Técnica HYDRAGEL 4 IF

Migración de cuatro (4) muestras diferentes de sueros patológicos : Dos sueros con una fuerte gammapatía monoclonal, un suero que presenta dos paraproteínas débiles y un suero que presenta una paraproteína fuerte y otra débil.

La migración y la inmunofijación de cada muestra han sido realizadas en 10 geles de HYDRAGEL IF 2/4 de 3 lotes diferentes, seguidas de una coloración con violeta ácido.

Técnica HYDRAGEL 9 IF

Migración de nueve (9) muestras de suero patológicas que presentan una o varias paraproteínas.

La migración y la inmunofijación de cada muestras han sido realizadas en 10 geles de HYDRAGEL 9 IF de 3 lotes diferentes, seguidas por una coloración con violeta ácido.

En las dos técnicas, todas las muestras analizadas proporcionan los mismos resultados para los 3 lotes de geles probados. Los perfiles obtenidos son característicos de las muestras analizadas y la inmunofijación pone en evidencia las bandas monoclonales esperadas en todas las muestras.

Exactitud

Técnica HYDRAGEL 4 IF Violeta ácido

Setenta y tres (73) muestras diferentes de sueros patológicos, once (11) sueros normales y doce (12) orinas concentradas han sido analizados en paralelo en geles HYDRAGEL IF 2/4 y con otro sistema comercial de geles de agarosa.

Técnica HYDRAGEL 4 IF Negro amido

Veintiocho (28) muestras diferentes de sueros patológicos y cuatro (4) sueros normales han sido analizados en paralelo en geles HYDRAGEL IF 2/4 y con otro sistema comercial de geles de agarosa.

Técnica HYDRAGEL 9 IF Violeta ácido

Noventa y cinco (95) muestras diferentes de sueros patológicos, cuatro (4) sueros normales y doce (12) orinas concentradas, han sido analizados en paralelo en geles HYDRAGEL 9 IF y con otro sistema comercial de geles de agarosa.

En las tres técnicas, los resultados obtenidos muestran una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis, y se han detectado las mismas bandas en todas las muestras patológicas analizadas, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a esta última técnica, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986).

Sensibilidad

Cuatro sueros con una gammapatía han sido diluidos serialmente y analizados con la técnica HYDRAGEL 4 IF, con coloración con violeta ácido y con negro amido.

Los resultados se resumen a continuación.

MUESTRA No.	BANDA MONOCLONAL		LIMITE DE DETECCION (g/l)	
	TIPO	CONC. (g/l)	HYDRAGEL 4 IF VIOLETA ACIDO	HYDRAGEL 4 IF NEGRO AMIDO
1	gamma kappa	10,9	0,12 0,12	0,12 0,12
2	gamma lambda	7,8	0,12 0,12	/ /
3	alfa lambda	5,8	0,12 0,12	0,25 0,25
4	mu kappa	3,4	0,12 0,12	0,12 0,12

Según la posición de la banda monoclonal, el fondo policlonal de la fracción de las gammaglobulinas y el colorante usado, el límite de detección de una paraproteína puede variar de 0,12 a 0,25 g/L.

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

Pour des informations complémentaires sur l'interprétation des profils obtenus par immunofixation, voir :

For additional information on interpretation of immunofixation patterns refer to:

1. Le Carrer Didier, "Électrophorèse des Protéines et Immunofixation : Guide d'interprétation", Laboratoires SEBIA, 1994, Hatier - Paris.
2. Keren D. F., "High Resolution Electrophoresis and Immunofixation Techniques and Interpretation", Butterworth-Heinemann, Woburn, Ma, USA, 2nd ed., 1994, 397 pp.
3. Su L, Keren DF, Warren JS. Failure of anti-lambda immunofixation reagents mimics alpha heavy-chain disease [letter]. *Clin. Chem.*, 41, 121-122 (1995).
4. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

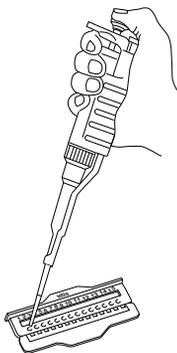


Figure 2

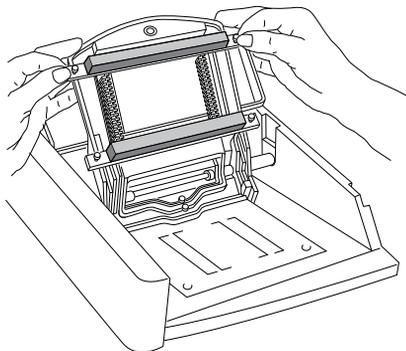


Figure 3

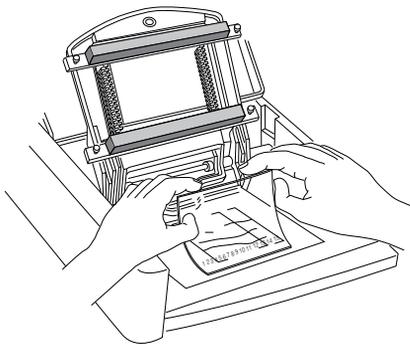
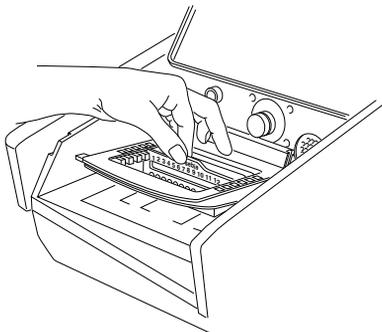


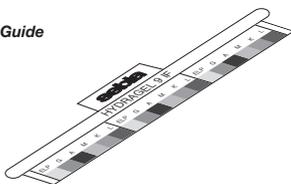
Figure 4



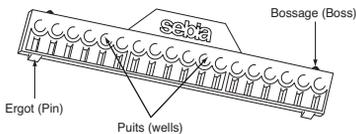
SCHÉMAS / FIGURES

Figure 5

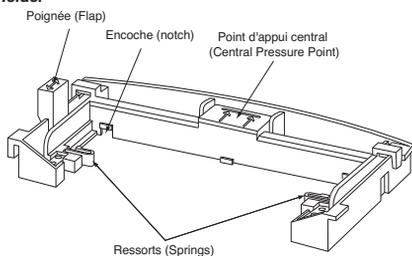
Repère couleurs
Colored Reference Guide



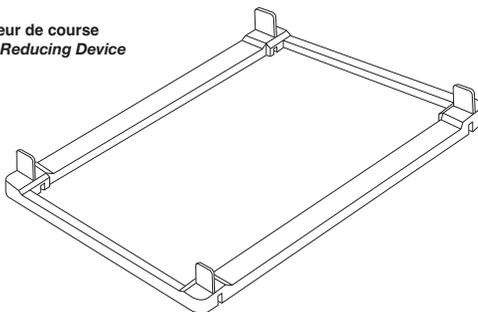
Barrette antisérums
Antisera Segment



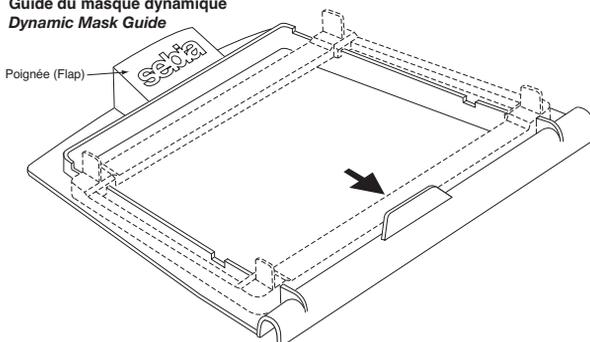
Support barrette
Segment Holder



Réducteur de course
Length Reducing Device



Guide du masque dynamique
Dynamic Mask Guide



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 6

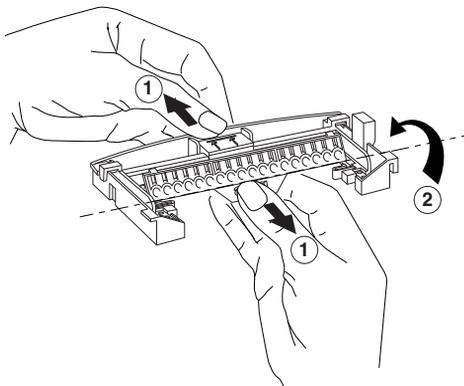


Figure 7

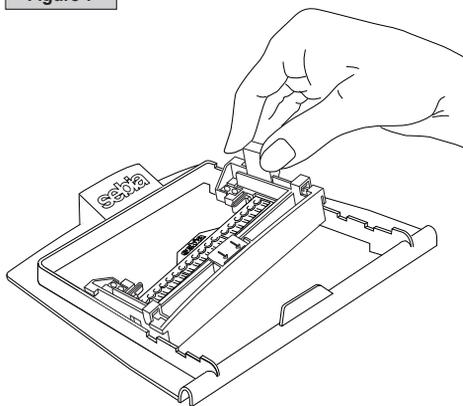


Figure 8

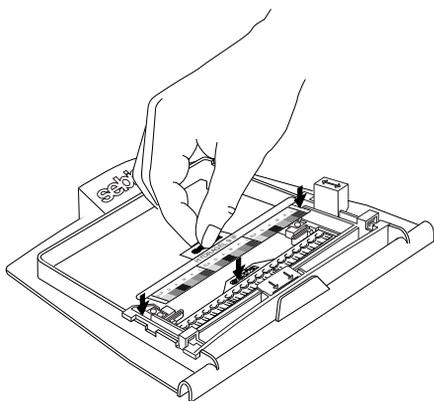


Figure 9

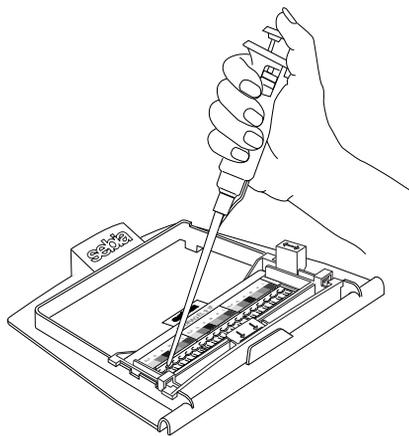


Figure 10

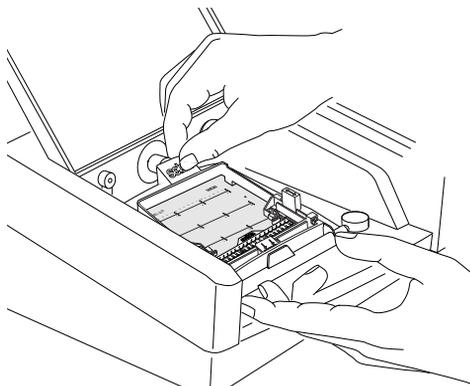
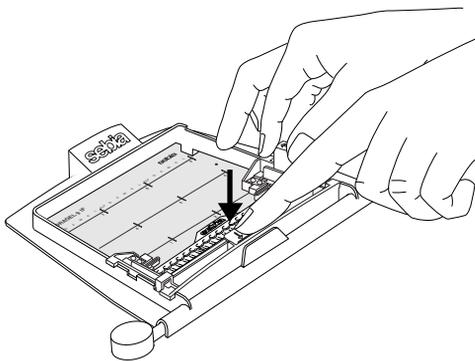


Figure 11



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 12

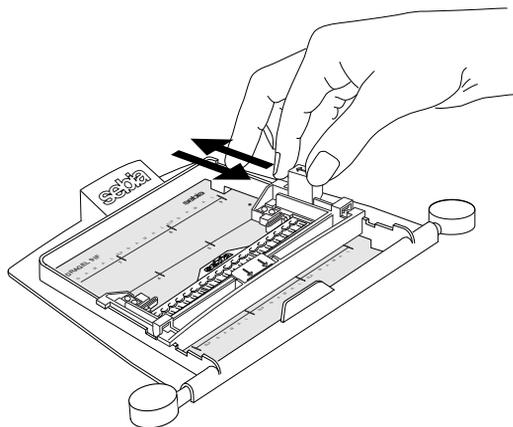


Figure 13

